云 南 植 物 研 究　1994; 16 (2): 169—177
Acta Botanica Yunnanica

天麻中抗真菌蛋白质的诱导和积累*

胡 忠 黄清藻
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要 前曾报告从天麻(*Gastrodia elata* Bl.)中分离出一种对木霉菌丝生长有强抑制作用的蛋白质，命名为天麻抗真菌蛋白，简称 GAFP，也称为 Gastrodianin。对不同天麻材料来源的 GAFP 分析表明：GAFP 的相对分子量为 14kD，等电点可能不同，变动范围 8.1–9.3。体外抑菌试验证明 GAFP 对腐生性真菌如木霉和密环菌等有强抑制活性，半抑制浓度 IC 0.5 为 0.08mg／mL；对寄生性真菌如棉花枯萎病和稻瘟病作用很弱。对球茎生长期中 7 个阶段 GAFP 的含量测定和 GAFP 免疫荧光组织定位观察证明：1.GAFP 是营养茎被密环菌侵染诱导而后大量合成的，合成部位可能是大型细胞。2.GAFP 由营养茎输送到顶生球茎，积累于皮层细胞中，是皮层细胞的主要蛋白成分。3.营养基衰败后，顶生球茎 GAFP 的总量下降不多，直至抽苔时转移到花茎中。结果说明 GAFP 是天麻的一种重要功能蛋白质，是使顶生球茎处于拒菌状态的主要物质。

关键词 天麻, 天麻抗真菌蛋白 GAFP, 密环菌

INDUCTION AND ACCUMULATION OF THE ANTIFUNGAL PROTEIN IN GASTRODIA ELATA

HU Zhong, HUANG Qing–Zao
(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,* Kunming 650204)

Abstract *Gastrodia elata* Bl. is a plant belonging to orchid family which is parasitic on fungus *Armillaria mellea.* The fungal hyphae infect the ancestor or nutritive corms of the plant,but are arrested and digested in the cortical cells. The released nutrients are mainly transported into the terminal corms for its growth. The fungi can never infect into the terminal corm. In 1988 we purified a 14kD protein named Gatrodia Antifungal Protein (GAFP) or gastrodianin, which was showed to be of strong antifungal activity to *Trichoderma viride*. In this paper we report that the isoelectric point of the 14kD protein may fluctuate from 8.1 to 9.3, depended on material resources. The *in vitro* tests of antifungal activity showed that GAFP inhibites specifically the growth of seprophytic fungi as *Armillaria mellea* and *Trichoderma viride* strongly with a half inhibition concentration (IC 0.5) of 0.08mg／mL, but inhibites very weakly the parasitic fungi as *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Pyricularia oryzae* etc. The quantitation of GAFP in corms at 7 stages of a complete period of vegetative propagation and the localization of GAFP in corms by immuno–fluorescence method showed that a stimulating increase in 15 times of GAFP

* 国家自然科学基金资助项目(3880518)
1993–05–10 收稿, 1993–06–05 修回

in the nutritive corms is induced by the infection of fungi, probably the induced synthesis happens in the large cells. The GAFP is continually transported to the terminal corm and accumulatd in the cortical cells with a high concentration of about 1.5mg / g of fresh tissue that is enough to prevent the infection of fungi. After the decay of the nutritive corm most of GAFP in terminal corm can maintain till the GAFP is transported into flower stem when the flower bud sprouts. It was deduced that GAFP is an important protein functioning in the defense mechanism of rectricting the infection of *Armillaria mellea* in *Gastrodia elata*.

Key words *Gastrodia elata*, Gastodia antifungal protein (GAFP), Gastrodianin, *Armillaria mellea*

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是真菌寄生类型的兰科植物。由于是著名的传统中药材，对于其生活习性、栽培和形态学已经积累了详细的资料[1]。天麻通常营无性繁殖。种麻于12月播种于埋有长满密环菌(*Armillaria mellea* Fr.)的松木的土壤中。翌年4月种麻(营养茎)为密环菌侵染，侵入球茎的菌丝被阻抑于皮层并被消解。消解产物经过加工后供给顶芽生长，形成顶生球茎。至7月，顶生球茎生长达到最大体积，营养茎则衰败脱落；至11月，顶生球茎内含物已充盈，顶端形成花芽，此时可收获加工成商品天麻。留在土壤中的顶生球茎于次年4月消耗内含物，抽苔、开花。在整个生长周期中，天麻与密环菌存在着密切的关系。一方面，密环菌侵染营养茎是天麻取得营养物赖以生存的必要条件，另一方面天麻为了自身的正常生长发育，严格限制密环菌的侵染范围。在营养茎中密环菌侵入不能越过皮层；顶生球茎则从形成直至抽苔，一直处于拒菌状态。这说明，天麻对密环菌侵染有着严密的防卫机制。1988年我们报告了从天麻中分离出一种对木霉和密环菌菌丝生长有强抑制作用的蛋白，命名为天麻抗真菌蛋白，简称GAFP[2]，也称为Gastrodianin，推测它在防卫机制中起重要作用。我们又证明，在植物界中较普遍存在的几丁酶和β-1,3葡聚糖酶在天麻抗菌机制中作用甚微[3]。围绕GAFP进行的生物化学研究，对于认识天麻与密环菌相互关系的分子基础有重要价值。本文报告在天麻球茎中合成和积累与密环菌侵染的关系。

材料和方法

1.材料

供试天麻为人工栽培的红天麻(*G. elate* f.*elata*)。于不同季节采集不同生长阶段的球茎。由于个体之间差异很大，即使同一栽培点在同一季节采集的天麻，球茎在感菌情况、个重和生长期等差异仍很大。因此根据形态特征作选择。图4叙述天麻7个生长阶段的特点，图6:1—6可见其典型的形态特征。此外，为了尽可能减小个体差异，测定球茎蛋白含量时所用样品每组不少于5个球茎。

2.蛋白质的分离和纯化

自天麻中分离和纯化蛋白基本上按原来程序操作[2]，简要如下。将鲜球茎切碎，于0.2mol / L的氯化钠溶液中匀浆，$10^4 \times g$冷冻离心去残物。提取液加0.8饱和度硫酸铵沉淀，沉淀物用适量的水溶解，除去不溶物，对水充分透析。离心去沉淀后的清液即为总蛋白溶液。将其通过DEAE-Sephadex柱(pH6.0)，吸留除去色素和酸性蛋白。流出液经过适当超滤浓缩后通过Sephdex- G50凝胶过滤分成G1和G2两个组分(图1)。G2组分上CM-Cellulose柱作离子交换层析，pH6.5的0.05mol / L磷酸钠盐缓冲液平衡，用0-0.3mol / L的氯化钠溶液(pH6.5)梯度洗脱，通常得到二个具有抗真菌活性的组份GAFP-1和GAFP-2(图2)。

3.蛋白质的定性和定量分析

蛋白质的分子量用Lammeli系统的SDS-PAGE分析，胶浓度15%，考马氏兰染色。蛋白质等电点

用加有 2% pH3.5-10 Ampholine 的盘状聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测定。由于天然 GAFP 与考马氏兰试剂无显色反应，不能比色测定蛋白含量。总蛋白用元素分析仪测定总氮乘以系数 6.25 得到。GAFP 一般用较大量的样品经分离纯化、冻干，称量。少量的纯化 GAFP 样品根据溶液的 278nm 吸收值计算。结合态 GAFP 依据 SDS-PAGE 图作光密度扫描定量。

4.抗真菌活性的测定

定性检测 直径 9 cm 培养皿中加 8mL 马玲薯葡萄糖琼脂(PGA)培养基，在中心处接种绿色木霉(*Trichoderma viride*)孢子，于 25℃ 培养。待菌丝向外生长的半径约 3cm 时，将待试验的无菌样品溶于 pH6.5 的 0.05mol／L 磷酸钠盐缓冲液中，浓度为 0.5—2.0mg／mL，在菌丝外端前面 0.5cm 处培养基表面滴上样品液 5μL，小心移动培养皿到培养箱中培养 6—24 小时，观察并照相记录菌丝生长被抑制的情况。样品对其它真菌菌丝生长抑制的定性检测同上处理。

定量测定 上述方法和文献中报告的类似检测方法中，菌丝生长受抑制程度除与样品抑菌活性外还与滴加样品的浓度、时间和位置、培养基厚度、蛋白质的扩散速度及菌丝生长速度均有关，因此很难定量。为此我们制订了如下改进方法，在恒定浓度下定量蛋白的抑菌活性。首先配制浓度为 5mg／mL 的无菌样品液，并作连续 2 倍稀释，连同空白共 6 组。准备 4×6 孔直径为 1.4cm 塑料培养盒一个。分别将 6 组样品液 50μL 置于孔中，重复三次。迅速加入予热于 60℃ 的 PGA 培养基各 0.20mL；混匀，冷却凝固。这样，培养基中样品的浓度各为 1、0.5、0.25、0.125、0.063、0mg／mL。将真菌的孢子悬液少量分别滴在各皿中心培养基表面，盖上盖，置于 25℃ 培养。待 0 号菌丝生长刚好盖满皿底时，测量各皿菌丝生长的直径，作菌丝生长直径与样液浓度的相关图。以 0 号为 1 求得菌丝生长长度受抑一半量的样液浓度，记为 IC 0.5，以此表示样品对就试真菌的抑菌活性。对于难得到孢子的真菌可用菌丝作为菌源。这一方法不适用于易形成气生菌丝的真菌。

5.GAFP 的组织定位

鲜天麻用 FAA 固定液固定，石蜡包埋切片。染色液为 1%考马氏兰 R250，溶剂是含有 10%乙酸的 20%甲醇溶液，染色 30 分钟，用上述溶剂适度脱色并经系列脱水后封片镜检。用这种方定位总蛋白。

GAFP 的免疫荧光定位 按 Vaitmkaitis 方法制备 GAFP 的兔免疫抗血清[4]，GAFP 加完全佐剂作兔背部多点皮内注射，每只兔 0.1mg。用琼脂板双扩散法检得抗体效价不低于 64，抗体对 GAFP 呈特异沉淀反应。采用低温透析法用 FITC (Sigma 产品)荧光标记免疫球蛋白，抗体的纯化以及标记方法见文献[5]。天麻球茎徒手切片，标本用 95%乙醇固定 10 分钟，经 PBS 充分洗涤后转到荧光标记的抗体溶液中于室温下浸泡 15 小时，充分洗涤后于荧光显微镜下观察照相记录。

结果与讨论

1.天麻抗真菌蛋白的理化性质

前文报告天麻抗真菌蛋白(GAFP)的分子量为 14kD，等电点 pH8.1。对许多样品的测定证明：GAFP 的相对分子量 14KD(图 5)，但等电点不均一。图 2 示天麻蛋白在阳离子交换介质上用线性洗脱可得二个抗真菌组份，等电点聚焦电泳上测得等电点各为 8.1 和 8.5。从不同来源天麻提取的 GAFP 等电点可能有差异，变动的范围在 8.1—9.3。但它们在 SDS-PAGE 上均为单一的 14kD 带而且紫外光谱未见差异。对这一现象的解释是：GAFP 高含天氡氨酸和天冬酰胺[2]，蛋白酰胺化程度不同引起等电点差异。GAFP 在 0.1 mol／L 的 NaOH 溶液中于室温下放置 1 小时，可导致部分脱酰胺，其等电点明显降低。

用酚-硫酸法测定浓度为 5mg／mL GAFP 溶液的含糖量，测定液的光吸收小于 0.05，因此 GAFP 冻干粉含糖量小于 0.05%，从老化的顶生球茎分离 GAFP 过程中用 Sephadex G50 分级，其图谱与幼嫩

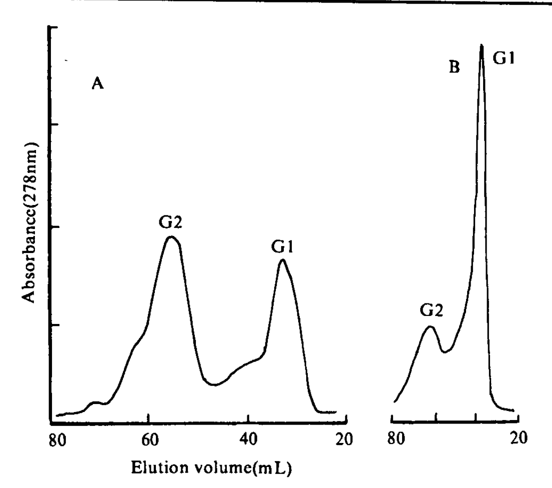


图1 天麻球茎蛋白的Sephadex-G50凝胶过滤层析。pH6.5的磷酸缓冲液洗脱，游离GAFP在G2部分中。材料A.生长中的顶生球茎，B.抽苔前老化的顶生球茎，其G1中有结合的GAFP。

Fig. 1 Gel filtration of proteins from growing terminal corm(A) and old terminal corm(B). Column was eluted with o.o5 mol／L of phospate buffer pH6.5.Free GAFP was in fraction G2. In Gl of B there was also GAFP which is in a bound state.with carbohydrate, phenolic compounds and orther proteins.

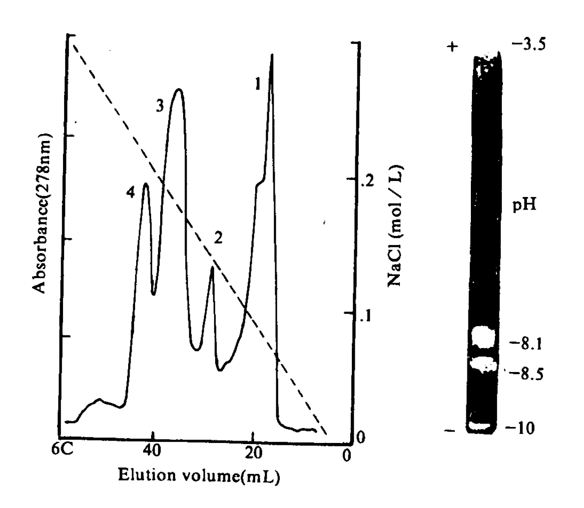


图2 天麻球茎蛋白G2组分的CM-cellulose离子交换柱层析。0—0.3mol／L的Nacl溶液(PH6.5)梯度洗脱。峰3，4为GAFP-1和GAFP-2，等电聚焦电泳图示等电点各为8.1和8.5。

Fig. 2 Ion exchange chromatography on CM-cellulose of G2 fraction. A gradient elution with 0—0.3 mol／L of NaCl (pH6.5) was performed to get GAFP-1 (peak 3)and GAFP-2 (peak 4) with pI of 8.1 and 8.5 respectively in IEF-PAGE.

顶生球茎明显不同(图1)：G1组份很大，往往含有色素，而G2峰很小。SDS-PAGE和免疫双扩散试验均证明，幼嫩顶生球茎的G1不含GAFP，而老化球茎的G1含有GAFP。这表明，在老化球茎中一部分GAFP与其他蛋白、糖及色素形成分子量大于30kD的结合物。GAFP结合状态是随着球茎老化而发生的。

2.GAFP的抗菌谱

体外抑菌试验结果(图3)显示，在平板培养基上每点滴加5μg的GAFP对木霉和羊肚菌(*Morchella conica* Pers)的菌丝生长有强抑制作用；滴加0.5μgGAFP可见抑制区。GAFP对棉花枯萎病(*Fusarinm oxysprum* f. *vasinfectum*)菌丝生长的作用很弱。用本文所述定量结果，GAFP对绿色木霉菌丝生长半抑制浓度(IC0.5)为0.08mg／mL，对棉花枯萎病菌的IC0.5为1.2mg／mL，是前者14倍。图3显示GAFP与作者从商陆种子分离的商陆抗真菌蛋白(PAFP)明显不同：PAFP对木霉和羊肚菌的抑制活性与GAFP相近，而且对棉花枯萎病菌也有明显抑制作用。对小麦赤霉病菌、蕃茄枯萎病菌和烟草黑胫病菌等作物病原菌试验结果同于棉枯萎病菌。这表明GAFP对腐生性真菌有专一性的强抗菌活性。这种专一性是与天麻和密环菌之间在长期进化过程中形成的特殊关系相适应的。但另一方面这种专一性很窄，天麻即使积累大量GAFP这样的抗真菌蛋白，也不能防卫寄生性病原真菌例如尖孢镰刀菌的侵染，真菌病害仍是天麻栽培中存在的严重问题。

3.GAFP在营养茎中的合成

图4显示天麻不同生长阶段

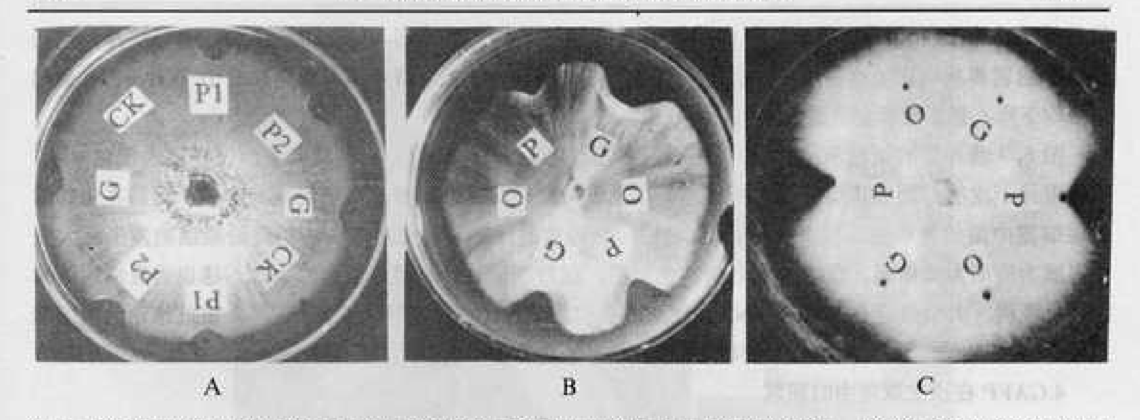


图 3 天麻抗真菌蛋白(G)和商陆抗真菌蛋白(P)对 3 种真菌菌丝生长抑制活性的比较。A.绿色木霉菌 *Trichoderma viride*，B.羊肚菌 *Morchelia conica*，C.棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*。每点加蛋白 5μg。

Fig. 3 A comparision of the antifungal activity to three species of fungi between GAFP and antifungal protein from Phytolacca (PAFP). Fungi for test. A. Trichoderma viride, B. Morchelia conica, C. Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum. 5 μg of proteins was loaded in each spot. Very weak antifungal activity of GAFP was showed in C.

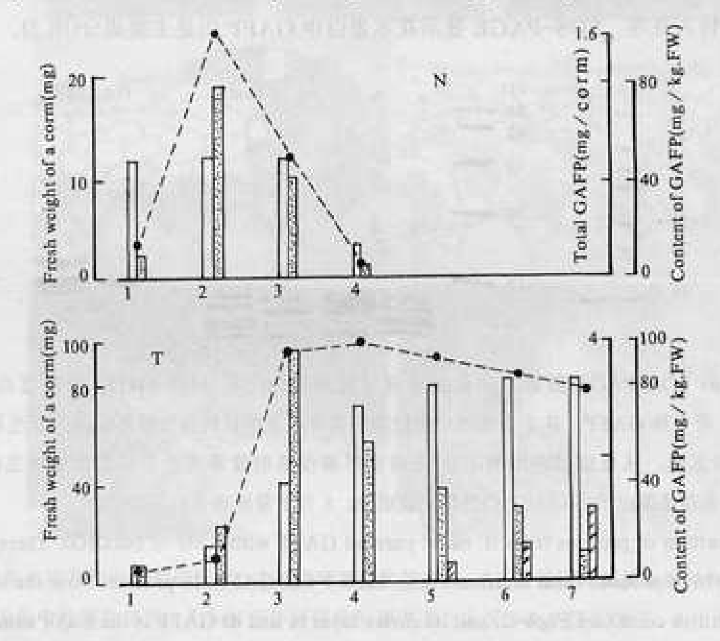


图 4 球茎一个生长期中各阶段的鲜重(□□)增长、GAFP 的含量(游离态□□，结合态▨/▨/)和总量(·—·—·)变化。N 营养茎，T 顶生球茎。生长阶段：1.种麻(营养茎)尚未受密环菌侵染。2.营养茎被密环菌侵染，顶生球茎生长。3.4.营养茎衰败，顶生球茎达最大体积。5.6.营养茎已掉落，顶生球茎内含物充盈。7.带花芽的成熟的顶生球茎。

Fig. 4 The fresh weight of a corm (□□), the content of GAFP (mg / kg freshweight) in free (□□) and bound state (□/▨/)and total GAFP in a corm (·—·—·) at different stages of growth of G.elata. N means nutritive corm, T terminal corm. Stage 1. N before infection of fungi(see plate 1A), stqage 2. N being infected by fungi and growing T (plate 1B and 2), stage 3.4. N being in decay and T attaining a maxium volume (plate 4), stage 5.6. T being in fulling of content, 7. mature T with flower bud.

GAFP 含量的变化。种麻在未被密环菌侵染时 GAFP 含量很低，为 5mg / kg 鲜重。被密环菌侵染缠绕

的营养茎，个重没有明显增加，而 GAFP 含量大幅度增加，可达到 80mg／kg 鲜重。随着营养物包括 GAFP 由营养茎向顶生球茎运输，顶生球茎迅速生长到最大体积，营养茎个重逐渐减小，GAFP 含量和总量均下降，最后营养茎衰败脱落。

图 6: 7 营养茎的蛋白质染色切片显示侵染过程细胞形态学变化。密环菌菌索越过皮层入侵营养茎，但被阻抑于皮层，菌索顶端裂开，释放出大量菌丝。菌丝只在皮层最内层的细胞间穿越。而后在相邻的皮层细胞中菌丝被细胞质包裹和消解(图 6: 8)，密环菌的侵染导致皮层内的一层淀粉层细胞发生巨大变化，成为所谓大型细胞，很深的蛋白质染色表明，这些细胞进行旺盛的蛋白质合成。这也为亚细胞结构观察所证明，大型细胞有丰富的 RNA，明显的核仁，线粒体和核糖体大为增加[6]。由此推论大型细胞是合成 GAFP 的位点。当然，这还须要进一步用分子生物学方法证实。

4.GAFP 在顶生球茎中的积累

图 4 测定结果显示，顶生球茎依靠营养茎提供营养迅速增重时，GAFP 含量和总量也迅速增加。生长中的顶生球茎中 GAFP 可高达 100mg／kg 鲜重，有的甚至可达到 200mg／kg 鲜重。随着营养茎逐渐消耗萎缩，球茎体积不再增大，每个球茎的 GAFP 总量达到最大值，例如个重 80 克的球茎，含有 4mg 的 GAFP。此后，球茎的内含物充盈，个体重略有增加，以单位鲜重计 GAFP 含量下降，每个球茎的 GAFP 总量下降不多。随着球茎的老化，一大部分 GAFP 转成结合态。当天麻抽苔时，GAFP 与其他营养物由球茎逐渐转入花茎。SDS-PAGE 显示花茎蛋白中 GAFP 仍是主要成分(图 5)。



图 5 天麻球茎蛋白的 SDS-PAGE 图谱。纯化的天麻抗真菌蛋白(G)，Mr＝14kD。天麻蛋白有 4 条分子量为 13-16kD 的蛋白带，带 3 是 GAFP。从正常被密环菌侵染的营养茎上生长的顶生球茎(a)及其顶生球茎的皮层(d)提取的蛋白中，GAFP 是主带。从皮层以内组织(C)和未被密环菌侵染的营养茎上生长的顶生球茎(b)提取的蛋白中，GAFP 含量甚微。天麻花茎蛋白(f)中 GAFP 仍然是主要成分。S 分子量标准蛋白。

Fig. 5 SDS-PAGE pattern of proteins from *G. elata*. purified GAFP with a Mr of 14kD(G). There were four components with Mr of 13-16 in proteins from terminal corm, band 3 was GAFP. In proteins from the terminal corm on a normally infected nutritive corm (see Fig.6-2) and its cortex layer (a and d) GAFP is the major component. In protein from inner part of a normal terminal corm(c) and the corm on a no infected nutritive corm (b, see also Fig.6-3) GAFP is the very minor component. In flower stem protein GAFP is also the major one(f).

GAFP 的免疫荧光组织定位显示(图 6-9)，顶生球茎中 GAFP 主要积累在皮层组织细胞的细胞质中，这些细胞大约 6 层，排列紧密，很少液泡。GAFP 也分布在输导组织中(图 6-10)。这表明，GAFP 可能是由营养茎经筛管输到顶生球茎的。图 5 是球茎皮层和皮层以内组织的蛋白质的电泳图。天麻蛋白质包含有分子量在 13-16kD 的 4 条蛋白带，其中带 3 是 GAFP。皮层以内组织的蛋白中，GAFP 带很弱，这些 GAFP 位于输导组织中，大量的淀粉层细胞不含 GAFP。皮层细胞蛋白的 GAFP 带很强，光密度扫描定量得知该带占总蛋白的 80%。测定表明，皮层细胞含 GAFP 高达 1.5mg／g 鲜量，这一浓度 20 倍于 GAFP 对腐生真菌菌丝生长的半抑制浓度。显然，皮层成为密环菌菌丝难以穿越的阻挡层，是

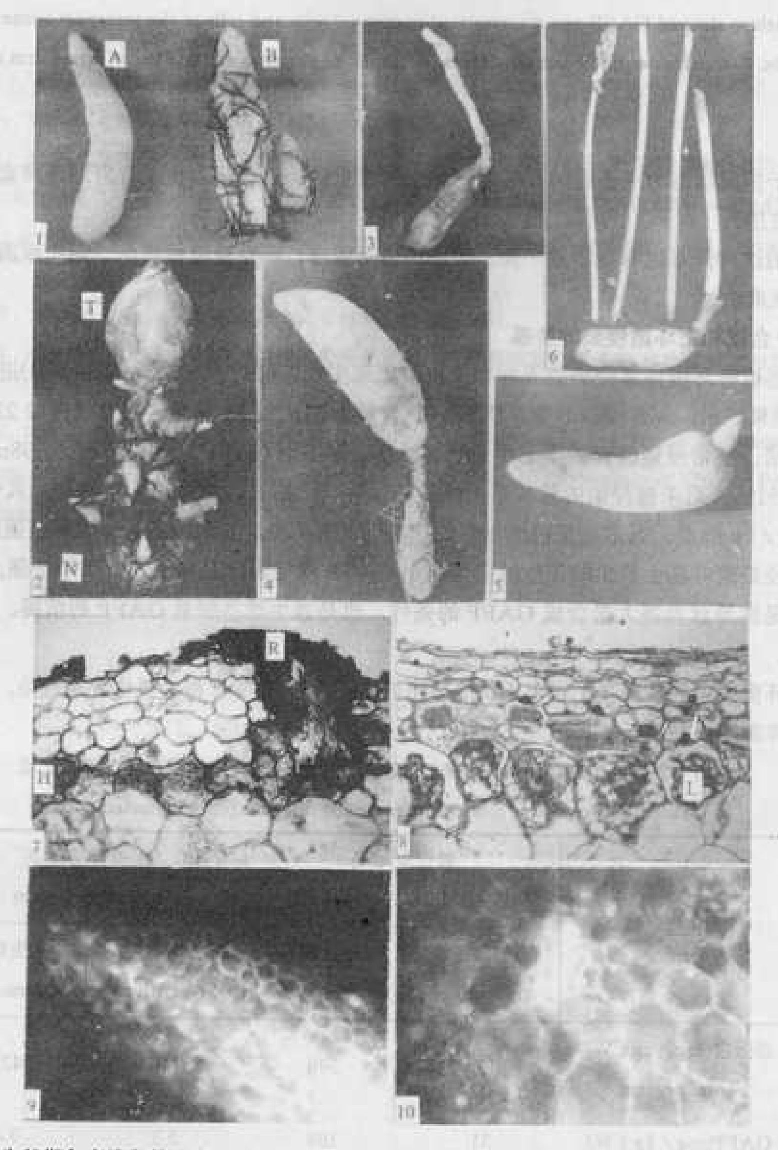


图6 1—6.天麻生长期各个阶段的形态.1A.未被密环菌侵染的种麻。1B.已被密环菌侵染的种麻(营养茎)。2.被密环菌侵染的营养茎上生长中的顶生球茎。3.未被密环菌侵染的营养茎上生长不良的顶生球茎。4.生长达最大体积的顶生球茎，营养茎已萎缩衰败。5.顶端已长花芽的成熟顶生球茎。6.已抽苔开花的天麻。7.密环菌菌索侵人营养茎+菌丝在皮层最内层细胞穿越，8.菌丝被皮层细胞质包裹和消解，最外的一层淀粉细胞转变成大型细胞，考马氏兰染色。9.10.免疫荧光定位显示GAFP积累在皮层细胞的细胞质和输导组织中。7.8.9.10. 400X；图中N营养茎，T顶生球茎，R、H密环菌菌索和菌丝，L大型细胞。

Fig. 6 1—6 Typical forms of *Gastrodia elata* at different stages. 1. ancestor or nutritive corm before being infected (A) and normally infected (B); 2. infected nutritive corm and growing terminal corm on it; 3. thin and long terminal corm on a no infected nutritive corm; 4. terminal corm at a maximum volume and nutritive corm decayed; 5. mature terminal corm with a flower bud on top; 6. sprouting and flowering corm. 7. rhizomorph of *A. mellea* inserted into a nutritive corm and hyphae penetrated in inner cortical cells; 8. In a nutritive corm hyphae were wraped and digested in cortical cells and the outer layer of starch cells transformed into large cells deeply stained by Coomasie blue; 9.10 immuno-

fluorescence pattern showed GAFP was accumulated in cortical cells and cells of the transport tissue of terminal corms. In 7.8.9.10, 400x. N nutritive corm; T terminal corm; R and H rhizomorph and hyphae of Armillaria mellea; L large cell.

顶生球茎处于拒菌状态的主要原因。有时可观察到老化的顶生球茎表皮上有密环菌菌索附着，但密环菌决不会侵入皮层。

GAFP 的这种分布也有脆弱的一面，天麻的皮层很薄，一旦受机械损伤，则病原菌很容易侵入内部组织，导致天麻腐烂。

5.GAFP 合成和密环菌侵染的关系

将营养茎被密环菌正常侵染的天麻和未被侵染而生长不良的天麻(图 6-2 和 6-3)进行比较分析，结果见表 1。结果显示，正常侵染的营养茎 GAFP 含量为 31mg／kg 鲜重，占总蛋白的 23%，是未侵染的营养茎的 6 倍。正常侵染的营养茎上生长旺盛的顶生球茎中 GAFP 的含量可高达 198mg／kg 鲜重，占其总蛋白的 51%，而未被侵染的营养茎上生长的顶生球茎细长，总蛋白质虽然高，其中 GAFP 含量很低，为 7.3mg／kg 鲜重，只占总蛋白的 1.7%。电泳谱(图 5)清楚显示，正常顶生球茎蛋白中 GAFP 是主带，而未被侵染营养茎上长出的顶生球茎蛋白中 GAFP 带很弱，其他 1、2、4 带很强。这些结果表明，密环菌侵染是诱导营养茎大量合成 GAFP 的条件，也是顶生球茎积累 GAFP 的前提，顶生球茎自身不合成 GAFP。

未受密环菌侵染的营养茎上长出细长的顶生球茎 GAFP 很少，极易受密环菌侵染，这是天麻为找寻密环菌即营养源的一种生长方式。

表 1 营养茎被密环菌正常侵染的天麻与未被侵染的天麻中蛋白质含量的比较

Table 1 The protein contents in normally infected and no infected corms

项目 Items	被侵染球茎 infected corm		未被侵染球茎 no infected corm	
	营养茎 Nutritive	顶生球茎 Terminal	营养茎 Nutritive	顶生球茎 Terminal
总蛋白(mg／kg FW) Total protein	138	390	116	423
GAFP(mg／kg FW)	31	198	5.3	7.4
GAFP／总蛋白(%) GAFP／Total (%)	23	51	4.6	1.7

结 论

本实验结果说明，天麻抗真菌蛋白是天麻营养茎受密环菌侵染的诱导而大量合成的，它稳定地积累于顶生球茎的皮层细胞中，它对于腐生性真菌的生长有很强的专一抑制活性，是天麻顶生球茎处于拒菌状态的主要物质，是天麻这样一种特殊营养进化类型的植物中起重要调节作用的功能蛋白。

致谢 周铉先生帮助采集和鉴定天麻。

参 考 文 献

〔1〕周 弦，杨兴华，刘成运.天麻形态学.北京：科学出版社，1987.

〔2〕胡 忠，杨增明，王钧.天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性.云南植物研究，1988，**10**(4)：373—380.

〔3〕杨增明，胡 忠.天麻球茎几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶的初步研究.云南植物研究，1990，**12**(4)：421—426.

〔4〕Vaitukaitis J L. production of antisera with small doses of immunogen: multiple injection. *Method in Enzymol.* **73**(B): 46—48.

〔5〕张龙翔，张庭芳，李令媛.生化实验方法.北京：高等教育出版社，1981.

〔6〕刘成运，张新生.天麻消化密环菌过程中超微结构的变化及酸性磷酸酶细胞化学定位.植物学报，1983，**25**(4)：301—305.

〔7〕Hu Z, Liu X Z, Huang Q Z, Zhu X M, Yang D. Isolation, characterization and amino acid sequencing of an antifungal protein from the seeds of Phytolacca americana. in: Du Y C. ed. Proceedings of Chinese Peptide Symposium 1990. Beijing: Science Press, 1991. 3—7.